

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-151335

(43) 公開日 平成8年(1996)6月11日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 49/00	C			
// A 6 1 K 9/50	H			
47/34	D			

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平7-255641	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地
(22) 出願日	平成7年(1995)9月6日	(72) 発明者	筏 義人 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182
(31) 優先権主張番号	特願平6-258837	(72) 発明者	田畑 泰彦 京都府宇治市琵琶台3-8-16
(32) 優先日	平6(1994)9月27日	(72) 発明者	中村 順二 奈良県奈良市右京5丁目9 22-402
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	友平 裕三 徳島市西新浜町1-3-35-503
		(74) 代理人	弁理士 亀井 弘勝 (外1名)

(54) 【発明の名称】 超音波造影剤およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 造影効果の高い心筋超音波造影剤とその製造方法を提供する。

【解決手段】 生物分解性ポリマーを溶解した水不溶性の有機溶剤溶液に水を分散させてW/O型エマルジョンを調製し、ついでこのW/O型エマルジョンを、乳化剤を含む水中に分散、乳化させてW/O/W型エマルジョンを調製した後、前記有機溶剤を除去して前記生物分解性ポリマーを固化させ、さらに水を除去して微粒子からなる超音波造影剤を製造するにあたり、前記W/O型エマルジョンの水への二次乳化時に、攪拌して、W/O型エマルジョン滴の径を小さくするとともに、W/O型エマルジョン滴の内水相の合一を促進させることにより、前記高分子の一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空微粒子を形成させ、さらに、中空微粒子の内部にペルフルオロカーボンのガスを充満させる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】生体吸収性高分子を溶解した水非混合性の有機溶剤溶液に水を分散させてW/O型エマルジョンを調製し、ついでこのW/O型エマルジョンを、乳化剤を含む水中に分散、乳化させてW/O/W型エマルジョンを調製した後、前記有機溶剤を蒸発除去することで生体吸収性高分子を固化させ、さらに水を除去する、微粒子からなる超音波造影剤の製造方法であって、前記W/O型エマルジョンの水への二次乳化の際に、攪拌して、W/O型エマルジョン滴の径を小さくするとともに、W/O型エマルジョン滴の内水相の合一を促進させることを特徴とする、前記高分子の一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空構造を有する微粒子である超音波造影剤の製造方法。

【請求項2】前記有機溶剤溶液に分散させる水が、有機溶剤溶液とほぼ同じ比重になるように無機塩を含有した請求項1記載の超音波造影剤の製造方法。

【請求項3】平均粒子径が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ の微粒子である請求項1記載の超音波造影剤の製造方法。

【請求項4】前記マイクロカプセル状の中空構造を有する微粒子を水中に分散させた後、減圧下で乾燥し、ついで減圧状態の乾燥機内にペルフルオロカーボンのガスを充満させることにより、前記ガスを微粒子の中空構造の内部に充満させる請求項1記載の超音波造影剤の製造方法。

【請求項5】前記有機溶剤に溶解させる生体吸収性高分子が、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトンおよび $\epsilon$ -カプロラクトンと乳酸もしくはグリコール酸との共重合体からなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の方法によって得られる超音波造影剤。

【請求項6】生体吸収性高分子の一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空構造を有する微粒子であることを特徴とする超音波造影剤。

【請求項7】心筋造影用、心腔造影用または肝臓造影用である請求項6記載の超音波造影剤。

【請求項8】前記中空構造の微粒子内部がペルフルオロカーボンのガスで満たされている請求項6記載の超音波造影剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、経口または非経口的に生体内に投与され、超音波診断のために使用される超音波造影剤およびその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】従来の液体中に分散された微細な気泡、すなわちマイクロバブルは、超音波診断または検査のために非常に効果的な超音波フレクチャーであることはよく知られている。しかし、マイクロバブルは短時間に、安定剤を添加

した状態でもせいぜい数分間で消失してしまうため、マイクロバブルの調製後直ちに生体内に投与する必要がある、実際の使用は困難であった。また、生体内に投与後、血管を通しての透過を容易にするためには気泡のサイズが約 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲にあることが必要であるが、生成される気泡の多くは $40 \sim 50 \mu\text{m}$ 程度であり超音波診断に不適切である。

【0003】これらの問題を解消するために、ポリマーの微小球であるマイクロバルーンを生体内に投与することが提案されている（例えば特開平3-503684号公報）。しかし、従来の方法によって得られるマイクロバルーンは、大量に投与しなければ、造影効果（コントラスト効果）が得られなかった。特に心筋を造影する有効な造影剤がなかった。その原因は、微粒子内部での中空構造がなく、多くの気泡を含んだ均一な微粒子が得られにくいことに起因している。かかるマイクロバルーンの大量投与は、生体に過度の負担をかけ、安全性の問題も惹き起させる。

【0004】本発明の主たる目的は、上述の問題点を解決し、微粒子中に多くの気泡を含ませるために、生体吸収性高分子の一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空構造をもつ微粒子を選択的に多く得ることができ、高い造影効果を発揮する心筋超音波造影剤およびその製造方法を提供することである。本発明の他の目的は、心筋、心腔または肝臓の造影効果の高い超音波造影剤を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明の超音波造影剤の製造方法は、生体吸収性高分子を溶解した水非混合性の有機溶剤溶液に水を分散させてW/O型エマルジョンを調製し、ついでこのW/O型エマルジョンを、乳化剤を含む水中に分散、乳化させてW/O/W型エマルジョンを調製した後、前記有機溶剤を蒸発除去することで生体吸収性高分子を固化させ、さらに水を除去して、微粒子からなる超音波造影剤を製造するものであって、前記W/O型エマルジョンの水への二次乳化の際に、攪拌して、W/O型エマルジョン滴の径を小さくするとともに、W/O型エマルジョン滴の内水相の合一を促進させることを特徴とする。

【0006】すなわち、本発明によれば、W/O型エマルジョンを乳化剤水溶液中へ分散させて、攪拌操作を加えて、W/O型エマルジョン滴の径を小さくし、さらに内水相の合一を促進することにより、単一層である高分子の有機溶剤溶液相で水を包んだカプセル構造を形成させる。この状態で有機溶媒を蒸発させ、水を除去することにより、生体吸収性高分子からなる一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空構造を有する微粒子の作成が可能となった。

【0007】従って、本発明は、かかる生体吸収性高分子の一枚膜をもつマイクロカプセル状の中空構造を有す

る微粒子である超音波造影剤をも提供するものである。この一枚膜構造をもつ中空微粒子は微粒子内部に多くの気泡を包んでいるため、超音波診断において高い造影効果を発揮する。とくに、上記微粒子を水中に分散させた後、減圧下で乾燥し、乾燥機内にペルフルオロカーボンのガスを充満させることにより、前記ガスを微粒子の中空構造の微粒子内部すなわち気泡内に充満させたときは、生体での超音波造影効果がより高い造影剤と得られる。

【0008】本発明の超音波造影剤は、心筋造影用、心腔（心臓を構成する心室、心房などの空間）造影または肝臓造影用として有用である。

【0009】

【発明の実施の形態】前記W/O型エマルションとは、水中にW/O型エマルション滴が分散し、このW/O型エマルション滴内に水滴が分散した3相構造からなるエマルションをいう。本発明における前記生体吸収性高分子としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸あるいはグリコール酸との共重合体、ポリクエン酸、ポリリンゴ酸、ポリ-α-シアノアクリル酸、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサレート、ポリテトラメチレンオキサレート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリエチレンプロピレンカーボネート、ポリ-γ-ベンジル-L-グルタミン酸、ポリ-L-アラニン、ポリ-γ-メチル-L-グルタミン酸、キチンなどがあげられる。これらのうち、本発明では、とくに、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリ-ε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸あるいはグリコール酸との共重合体、あるいはそれらの混合物があげられる。共重合体中の乳酸/グリコール酸の比は約100/0〜0/100であり、好ましくは乳酸が約50〜95重量%、グリコール酸が約50〜5重量%がよく、より好ましくは乳酸が約60〜85重量%、グリコール酸が約40〜15重量%がよい。

【0010】本発明に使用されるこれらの生体吸収性高分子の平均分子量は約1,000〜800,000、好ましくは約2,000〜100,000の範囲にあるのがよい。乳酸-グリコール酸共重合体を使用する場合は、その平均分子量は約3,000〜30,000のものを用いるのが好ましい。かかる生体吸収性高分子は水非混合性の有機溶媒に溶解して使用される。本発明において使用可能な水非混合性の有機溶剤としては、例えば塩化メチレン、クロロホルム、クロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素などのハロゲン化アルカン、酢酸エチル、エチルエーテル、シクロヘキサン、ベンゼン、n-ヘキサン、トルエンなどが挙げられ、これらは2種以上を混合して使用してもよい。

【0011】有機溶媒溶液中の生体吸収性高分子の濃度は、通常、0.5〜50重量%、好ましくは1〜30重量%で

あるのがよい。本発明の製造方法においては、まず、生体吸収性高分子を溶解した水非混合性の有機溶剤溶液に水を分散させてW/O型エマルションを調製する。ここで、水は、前記有機溶剤溶液と比重を合わせるために無機塩または有機塩を溶解させた水溶液の形態で有機溶剤溶液に分散させる。前記無機塩としては、例えば塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、臭化カルシウム、臭化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウムなどがあげられる。

【0012】また、有機塩としては、例えば酢酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸、コハク酸、リン酸、アスコルビン酸などの有機酸のナトリウム塩、カリウム塩などがあげられる。これらのうち、本発明では、とくに、経済性、比重の合わせ易さ、洗浄の容易さの点から塩化カルシウム水溶液を使用するのが望ましい。これらの無機塩または有機塩は、生体吸収性高分子の有機溶剤溶液との比重を合わせるうえで、約1〜60重量/容量%、好ましくは約20〜50重量/容量%の濃度となるように水に添加される。これにより油相内に水滴が均一に分散したW/O型エマルションを得ることができる。

【0013】W/O型エマルションを得るための乳化操作は、公知の分散法を用いて行われる。このような分散法としては、例えば断続振盪法、プロペラ型攪拌機、タービン型攪拌機などのミキサーを用いる攪拌法、コロイドミル法、ホモジナイザー法、超音波照射法などが挙げられる。本発明では、これらの方法を適宜組み合わせ使用してもよい。とくに、このW/O型エマルションを作成する一次乳化は、最終目的である中空微粒子の中空構造の均一性を保証するためには大切なステップである。いずれの微粒子にも同程度の一枚膜中空構造をもたせるためには、この段階で内部水相をできる限り生体吸収性高分子の有機溶剤溶液内に均一に分散させることが必要である。このためには、内部水相の水滴径をできるだけ小さくするのが好ましいので、超音波照射法を他の分散法と組み合わせる方法が好適に採用される。

【0014】について、このようにして調製されたW/O型エマルションを油相として、乳化剤を加えた水中に分散させてW/O/W型エマルションを調製する。乳化剤としては、安定なエマルションを形成するものであればいずれも使用可能であり、例えばオレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（アトラスパウダー社製のTween80、Tween60など）、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、部分酢化ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、それらの誘導体などがあげられ、これらのうちから2種以上を組み合わせ使用してもよい。このうち、本発明では、とくに、部分酢化ポリビニルアルコール、Tw

een 系界面活性剤などを使用するのが好ましい。乳化剤の濃度は、約0.01～20重量%、好ましくは約0.05～10重量%の範囲から適宜決定される。

【0015】前記乳化剤は、水中に投入されたエマルションの表面に付着してエマルションを安定化させる作用を有するので、前記W/O型エマルションを、その内部に水滴を含有したままで、安定に水中に分散させることができる。これにより、外から順に水相、油相および水相の3相構造が形成されることになる。油相(W/O型エマルション)：水相との比(重量比)は約1：100～1：1、好ましくは1：50～1：1の範囲である。

【0016】前記W/O型エマルションの水への乳化にあたっては、前記W/O型エマルションを水に分散させた後、攪拌操作を加える。攪拌操作としては、前述の乳化方法がいずれも採用可能であるが、とくにホモジナイザーを用いるのが単一層の有機溶剤溶液相で水を包み込んだ構造を有する有機溶剤溶液のマイクロカプセルを得るうえで好ましい。ホモジナイザーを用いる場合は、100～100,000rpm、好ましくは1,000～50,000rpmで0.1～30分間、好ましくは0.5～20分間操作するのがよい。

【0017】かかる操作により外部水相中のW/O型エマルション滴の径を小さくする。つまり、このホモジナイザーによる攪拌はW/O型エマルション滴内の水相の分散状態を変えることなく、W/O型エマルション滴の径を低下させるのに有効である。ここで、W/O型エマルション滴の径を1～20 $\mu\text{m}$ にまで低下させることが最終微粒子に高分子一枚膜構造に付与する一つのキープポイントである。次にこの状態で、プロペラ攪拌機等で攪拌下放置する。この際、W/O型エマルション滴中の内水相は不安定であるため、生体吸収性高分子の固化以前に互いに合一して混ざり合い、大きな一つの水滴になる。一方、W/O型エマルション自体は外水相内の乳化剤によって安定化されているため、結果として、水が単一層である高分子の有機溶剤溶液相で囲まれたカプセル構造が形成されることになる。

【0018】かかるカプセル構造をもつW/O型エマルション滴の形成を促すうえで、内水相の塩の種類およびその量、油相内のポリマーの濃度、油相(W/O型エマルション滴)およびこれを乳化させる外水相の各温度、さらに油相と水相の量比を適宜調節するのが好ましい。特に内水相内に無機塩を用いることで内水相の表面張力が増大し、水相の不安定化が促進され、粒子作成過程でW/O型エマルション滴内の水相がお互いに合一し、一枚膜構造のエマルションの割合が増加する。

【0019】前記油相の温度は約-20℃から有機溶媒の沸点までの範囲内で適宜決定されるが、通常は0～30℃の範囲であるのがよい。また、外水相の温度もこの範囲内で使用することができる。W/O/W型エマルションを調製後、油相から有機溶媒を除去する。有機溶媒の除去方法としては、例えば得られたW/O/W型エマルシ

ョンを攪拌下放置する、加温する、攪拌下減圧するなどの方法が挙げられる。攪拌は、例えばプロペラ型攪拌機、マグネチックスターラーなどで徐々に行う。

【0020】有機溶媒の除去に伴って、内水相が相互に混ざり合い、生体吸収性高分子の固化が進行する。固化を促進させるために、エマルションを徐々に加温してもよい。かくして一枚膜構造をもつマイクロカプセル状の中空微粒子が形成される。得られた微粒子は、遠心分離、ろ過などに捕集し、精製水で数回洗浄し、分散剤を加えた水に再分散させた後、乾燥する。前記分散剤は微粒子の凝集を防止する作用を有する。分散剤としては、例えばTween80 系界面活性剤、ショ糖脂肪酸エステル、マンニトール、ソルビトール、グルコース、ガラクトース、ショ糖などが挙げられる。この分散剤は約0.001～30重量%濃度で水に溶解して使用される。

【0021】また、生成した高分子一枚膜構造をもつ微粒子はそのまま再分散させてもよいが、その中には多孔質構造をもつものが若干含まれるため、洗浄後、低速で遠心分離して非沈澱物と沈澱物とに分けてもよい。この遠心分離は約50～3,000rpmの範囲の回転数で1～60分間行うのが適当である。また、遠心分離は数回行うのが好ましい。

【0022】遠心分離により非沈澱物相には生体吸収性高分子からなる一枚膜構造の中空微粒子が回収され、この一枚膜構造の中空微粒子を使用した超音波造影剤は高い超音波造影効果を発揮する。また、乾燥した微粒子を得るために、必要ならば加温して行う減圧乾燥法、凍結乾燥法などが使用可能であるが、凍結乾燥法を使用するのが好ましい。

【0023】かくして粒径が1～10 $\mu\text{m}$ の微粒子が得られる。この微粒子は後述の実施例に記載のように微粒子表面に孔のない、内部に中空体を多く含む球形である。本発明の超音波造影剤である微粒子の中空内にペルフルオロカーボンのガスを充填させるには、前記微粒子を水中で分散させた後、減圧下で乾燥し、ついで減圧状態の乾燥機内にペルフルオロカーボンのガスを注入し、好ましくは常圧に戻せばよい。

【0024】微粒子を分散させる水は、前述の分散剤を含んでいてもよい。減圧下での乾燥は、必要ならば加温して行う減圧乾燥法、凍結乾燥法などが使用可能であるが、凍結乾燥法を使用するのが好ましい。ペルフルオロカーボンとしては、造影剤を体内に投与した後も気体状態が維持されるように、沸点が体温以下、好ましくは、10℃以下であればよい。具体的には、オクタフルオロシクロブタン、オクタフルオロプロパン、ヘキサフルオロエタンなどがあげられる。また、使用するペルフルオロカーボンのガスは水に難溶性であるのが好ましく、これにより、血液等の体液内に溶解することがなく、造影効果の持続時間を長くすることができる。

【0025】本発明の方法によって得られる超音波造影

剤は、乾燥した微粒子状であるため、これを使用時に適当な水性キャリア（生理食塩水、マンニトール水溶液等）に分散させて経口的または非経口的に生体内に投与される。とくに、注射による投与が望ましい。前記水性キャリアには、必要に応じて公知の分散剤を添加してもよい。また、造影剤は水性キャリアを含む総量に対して0.01～80重量%、好ましくは0.01～50重量%の濃度となるように添加される。

#### 【0026】

##### 【実施例】

##### 実施例1

ポリDL乳酸（平均分子量7000）2.0gを塩化メチレン20mlに溶解した液に、44重量/体積%の塩化カルシウム水溶液12mlを投入し、振盪・攪拌してW/O型エマルジョンを調製した。さらに超音波を照射することにより内水相の径を小さくした。ついで、1重量/体積%ポリビニルアルコール水溶液200mlに小型ホモナイザー（キネマチカ社（スイス）製のポリトロン）で攪拌しながら前記W/O型エマルジョン32mlを投入し、W/O/W型エマルジョンとした。このW/O/W型エマルジョンを攪拌機で6時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させ、油相中のポリDL乳酸を固化させた。得られた微粒子を光学顕微鏡で観察すると、一部の粒子は一枚膜構造であった。微粒子を遠心分離により捕集し、同時に冷却した精製水で洗浄した後、0.1%Tween80水溶液で再分散し、凍結乾燥し、粉末状の微粒子である超音波造影剤を得た。

【0027】得られた微粒子の電子顕微鏡写真を図1に示す。微粒子の平均粒子径は約7.8 $\mu\text{m}$ であり、微粒子表面に孔が見られた。

##### 比較例1

内水相に1重量/体積%のポリビニルアルコールを含む44重量/体積%の塩化カルシウム水溶液12mlを用いる以外は実施例1と同様にして粉末状の微粒子を得た。

【0028】この微粒子を光学顕微鏡で観察すると、一枚膜構造の微粒子は殆ど見られなかった。また、この微粒子の平均粒子径は約3.3 $\mu\text{m}$ であり、微粒子表面には孔は見られなかった。

##### 実施例2

実施例1と同様にして微粒子を捕集した。さらに、微粒子を精製水で2回水洗した後、回転数500rpmで15分間遠心分離し、非沈澱物（A）と沈澱物（B）とに分ける操作を3回繰り返した。その結果、得られた粒子のうち、非沈澱物（A）：沈澱物（B）の割合は20：80であった。

【0029】非沈澱物（A）を0.1%Tween80水溶液で再分散し、凍結乾燥し、平均粒径が8.1 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子である超音波造影剤を得た。一方、前記沈澱物（B）についても、非沈澱物（A）と同様に再分散、凍結乾燥を行って、平均粒径が10 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子を得た。凍結乾燥前の微粒子の光学顕微鏡写真を図

2および図3に示す。図2は非沈澱物（A）の微粒子を、図3は沈澱物（B）の微粒子をそれぞれ示している。図から、非沈澱物（A）には一枚膜構造の微粒子が多いのに対して、沈澱物（B）には、粒子の内部に多数の空洞を有する多孔質構造の微粒子が多いことがわかる。

##### 比較例2

比較例1と同様にして微粒子を得た後、実施例2と同様の操作により非沈澱物（A）と沈澱物（B）とに分けた。その結果、得られた粒子のうち、非沈澱物（A）：沈澱物（B）の割合は10：90であった。

##### 実施例3

乳酸-グリコール酸共重合体（モル比が75：25、平均分子量6200）2.0gを用いる以外、実施例2と同様にして非沈澱物（A）と沈澱物（B）とに分離し、それぞれの微粒子を得た。

【0030】得られた微粒子のうち、非沈澱物（A）：沈澱物（B）の割合は重量比で約95：5であった。非沈澱物（A）を0.1%Tween80水溶液で再分散し、凍結乾燥し、平均粒径が6.7 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子である超音波造影剤を得た。一方、前記沈澱物（B）についても、非沈澱物（A）と同様に再分散、凍結乾燥を行って、平均粒径が7.8 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子を得た。

【0031】得られた微粒子の電子顕微鏡写真を図4に示す。図4は非沈澱物（A）の微粒子を示している。図4に示す微粒子表面には孔が殆ど見られないので、一枚膜構造微粒子となっているものと考えられる。

##### 比較例3

二次乳化時のホモナイザーの回転数をさらに高回転としたほかは、実施例3と同様の操作により微粒子を得た。

【0032】得られた微粒子のうち、非沈澱物（A）：沈澱物（B）の割合は重量比で約90：10であった。非沈澱物（A）を0.1%Tween80水溶液で再分散し、凍結乾燥し、平均粒径が4.1 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子である超音波造影剤を得た。一方、前記沈澱物（B）についても、非沈澱物（A）と同様に再分散、凍結乾燥を行って、平均粒径が5.1 $\mu\text{m}$ である粉末状の微粒子を得た。

##### 比較例4

外水相の1重量/体積%ポリビニルアルコール水溶液200mlにプロペラ型攪拌機で攪拌しながらw/o型エマルジョンを投入する以外、実施例3と同様にして粉末状の微粒子を得た。この微粒子を光学顕微鏡観察すると、微粒子径が約20～500 $\mu\text{m}$ であり、一枚膜構造の微粒子は殆ど見られず、多数の空洞を有する微粒子であった。

##### 比較例5

内水相に精製水12mlを用いたほかは、実施例3と同様の操作により微粒子を得た。得られた微粒子を光学顕微鏡観察すると、粒子径が20～50 $\mu\text{m}$ であった。

##### 試験例1

(in vitro)における超音波造影効果の試験) 図5 に示す試験装置を用いて超音波造影効果を調べた。すなわち、生理食塩水100ml を入れたポリプロピレン製の容器1 を水槽2内に固定し、容器1内に攪拌子3を入れ、マグネチックスターラーにて攪拌した。前記実施例および比較例で得た各微粒子の所定量を1重量/体積%のTween80水溶液1mlで懸濁し、生理食塩水中に投入した。ついで、5MHzの中心周波数をもつセクタ式プローブを装着した超音波画像診断装置(東芝社製のSONOLAYER  $\alpha$ SSH-140)により、容器1が画面上で中心に位置するようにスキャンした。そして、造影画面の静止画像において、容器1の前方部分または容器1内全体の輝点の明るさを求め、超音波造影効果の指針とした。

【0033】実施例1で得た微粒子状の超音波造影剤をいくつかの添加量にて前記生理食塩水100mlに投入し、容器1の前方部分の輝点の明るさの経時変化を調べた。その結果を図6に示す。図6に示すように、添加量が20mgのとき、初期の輝点の明るさの平均値は約25~28と一定であったが、経時的な減衰速度が異なっており、微粒子の濃度が薄いほど減衰速度が大きかった。一方、微粒子濃度が40mg以上の場合では、初期において音響影陰が見られ、輝点の明るさの初期値は他に比べて低く、約22であったが、その値は経時的に増大し、約8分で27程度まで上昇した。その後は、微粒子の濃度が高いほう(80mg)が高い輝点の明るさを持続していたが、濃度が低い方(40mg)では、徐々に減衰していった。

【0034】従って、40mg以上の濃度で使用すると、長時間にわたり高い造影効果を発揮するということがわかる。一方、実施例2で得た非沈澱物(A)の微粒子(以下、No. 2-Aという)と、沈澱物(B)の微粒子(以下、No. 2-Bという)、実施例3で得た非沈澱物(A)の微粒子(以下、No. 3-Aという)と、沈澱物(B)の微粒子(以下、No. 3-Bという)の各5mgを生理食塩水100mlに投入し、容器1の前方部分または容器1内全体の輝点の明るさの経時変化を求めた。その結果を図7および図8にそれぞれ示す。図7に示すように、容器1の前方部分における輝点の明るさは、初期においてはいずれも殆ど同等であるのに対して、経時的には2-Aおよび3-Aの微粒子のほうが2-Bおよび3-Bよりも減衰が少なく安定している。

【0035】また、図8に示すように、容器1内全体の輝点の明るさでは、2-Bおよび3-Bでは初期値が約18であるものの、その後は急速に減衰し、約10分後には輝点の明るさが約6を示した。これに対して、2-Aおよび3-Aでは初期値が2-Bおよび3-Bに比べて低いものの、2分経過後は2-Bおよび3-Bよりも高くなっていた。従って、一枚膜構造の微粒子のほうが長時間にわたり超音波造影効果の高いことがわかる。

#### 試験例2

体重約3kgの兔を麻酔下、仰臥位に固定し、胸部を剃毛

した。介耳静脈に18Gの留置針を固定し、三方活栓を取り付け、一方に生理食塩水の入った注射筒を取り付けた。実施例2で得られた微粒子状の超音波造影剤(非沈澱物(A))20mgを、0.1重量/体積%の濃度でTween80を含有した生理食塩水に懸濁した。この懸濁液を注射筒にとり、三方活栓に取り付けた。5MHzの中心周波数をもつセクタ式プローブを取り付けた超音波画像診断装置を用いて兔の心臓部をスキャンしながら、微粒子の懸濁液を投与した後、直ちに生理食塩水2mlを投与した。得られた二次元の超音波画像から、投与後2秒後より肺動脈が造影され始め(このとき、右心房、右心室はスキャンされていない)、約4秒後には音響影陰が見られ、同時に左心房も造影された。その後、肺動脈の音響影陰が弱まり、心腔全体が造影され、約20秒後には造影効果はほぼ消失した。超音波造影剤の投与量を2mgまで減らしても、左心房は造影された。

#### 試験例3

体重約20kgのイヌを麻酔下、人工呼吸器により呼吸を確保し、左胸部を開胸し、心臓を露出させた。頸部を切開し、頸動脈に冠動脈造影用カテーテルを挿入し、冠動脈入口部にカテーテルの先端を位置するようにした。実施例3で得られた非沈澱物(A)100mgを0.1重量/体重%の濃度でTween80を含有した生理食塩水2mlに懸濁した。この懸濁液を注射筒にとり、三方活栓に取り付けた。5MHzの中心周波数をもつセクタ式プローブで心臓部をスキャンしながら微粒子の懸濁液を投与した。

【0036】投与直後、わずかにアコースティック・シャドウが見られたものの、その後約20秒間にわたり心筋が造影され、約30秒後には造影効果はほぼ消失した。超音波造影剤の投与量を50mgにまで減らしても心筋は造影された。

#### 試験例4

体重3.5kgの兔を麻酔下、仰臥位に固定し、胸部、腹部、腰部を剃毛した。介耳静脈に18Gの留置針を固定し、三方活栓を取り付け、一方に生理食塩水の入った注射筒を取り付けた。一方、大腿動脈に向けて3Fのカテーテルを肝臓よりやや下部まで挿入した。肝臓を直接スキャンするため、正中より右側の上腹部を開腹した。

【0037】実施例3で得られた微粒子状の超音波造影剤(非沈澱物(A))40mgを、0.1重量/体積%の濃度でTween80を含有した生理食塩水0.8mlに懸濁した。この懸濁液を注射筒にとり、三方活栓に取り付けた。7.5MHzの中心周波数をもつリニア式プローブを取り付けた超音波画像診断装置を用いて兔の肝臓部をBモードでスキャンしながら、微粒子の懸濁液を静脈内投与した後、直ちに生理食塩水4mlを投与した。投与後、肝動脈、大動脈が造影され、約20秒間造影が持続した。同試料100mgを0.1重量/体積%の濃度でTween80を含有した生理食塩水3mlに懸濁した懸濁液を静脈投与した後、直ちに生理食塩水4mlを投与した。大静脈は投与3秒後より10秒ま

でよく造影され、その後、下大静脈も造影された。

【0038】同試料20mlを0.1重量／体積％の濃度でTween80を含有した生理食塩水0.8mlに懸濁した懸濁液を動脈内投与した後、直ちに生理食塩水4mlを投与した。肝動脈、門脈がよく造影され、約20秒間造影された。肝実質も造影された。一方、肝臓部分を同アプローブでカラー・ドップル法によりスキャンしながら、同試料40mgを0.1重量／体積％の濃度でTween80を含有した生理食塩水0.8mlに懸濁した懸濁液を静脈内投与した後、直ちに生理食塩水4mlを投与したところ、門脈の造影が増強され、20-30秒間造影が持続した。

#### 実施例4

生体吸収性高分子として、ポリDL乳酸に代えて、乳酸－グリコール酸共重合体（モル比が75：25、平均分子量5200）0.5gとポリ-L-乳酸（平均分子量8200）1.5gとを用いた以外は、実施例2と同様にして非沈澱物(A)と沈澱物(B)とに分離した。

【0039】ついで、回収した非沈澱物(A)を10重量／体積％－マンニトール水溶液に懸濁し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、減圧状態の乾燥機内にオクタフルオロプロパンのガスを注入し、常圧に戻した。その結果、微粒子の中空部内にオクタフルオロプロパンガスが充填された粉末状の微粒子を得た。凍結乾燥後の非沈澱物(A)のうちの50重量／重量％は、マンニトールであった。

#### 参考例

ペルフルオロカーボンに代えて、窒素ガス雰囲気を用いた以外は、実施例4と同様にし、微粒子の中空部内に窒素ガスが充填された粉末状の微粒子を得た。

#### 試験例5

体重約23kgの雑種犬を麻酔下、腹部を剃毛し、気管内挿入による人工呼吸下、前肢静脈に20Gの留置針を固定し、三方活栓を取り付け、一方に生理食塩水の入った注射筒を取り付けた。実施例4で得られた微粒子状の超音波造影剤（非沈澱物(A)）200mg（マイクロカプセルとして100mg相当）を10重量／体積％－マンニトール水溶液5mlに懸濁した。この懸濁液を注射筒にとり、三方活栓に取り付けた。前出の超音波画像診断装置を用いて犬の腹部をスキャンしながら、微粒子の懸濁液を投与した後、直ちに生理食塩水10mlを投与した。得られた二次元

の超音波画像から、投与約7秒後より肝実質の造影が認められ、約17秒後に門脈の造影が増強された。肝実質の造影は約1分間続いた。血管内造影は約3分間で消失した。

【0040】試験例5の結果より、微粒子内の中空構造にペルフルオロカーボンガスを充填した実施例4の造影剤は、より高い造影効果を有することがわかる。

#### 【0041】

【発明の効果】本発明によれば、生体吸収性高分子の一枚膜からなるマイクロカプセル状の中空構造微粒子を作製することができる。この中空微粒子は超音波診断において高い造影効果を発揮する超音波造影剤として有効である。とくに、本発明の超音波造影剤は心筋造影用または肝臓造影用として有用である。

【0042】また、本発明の方法では、用いる溶媒は殆どが水であり、生体吸収性高分子を溶解するための有機溶剤の使用量も少なく、また微粒子の洗浄も容易であり、従って安全で経済的であるという効果もある。さらに、上記微粒子の中空内にペルフルオロカーボンのガスを充満させたときは、生体での超音波造影効果がより優れた超音波造影剤を得ることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1で得た微粒子の構造を示す走査電子顕微鏡写真である。

【図2】本発明の実施例2で得た非沈澱物(A)の微粒子の構造を示す光学顕微鏡写真である。

【図3】本発明の実施例2で得た沈澱物(B)の微粒子の構造を示す光学顕微鏡写真である。

【図4】実施例3で得た非沈澱物(A)の微粒子の構造を示す走査電子顕微鏡写真である。

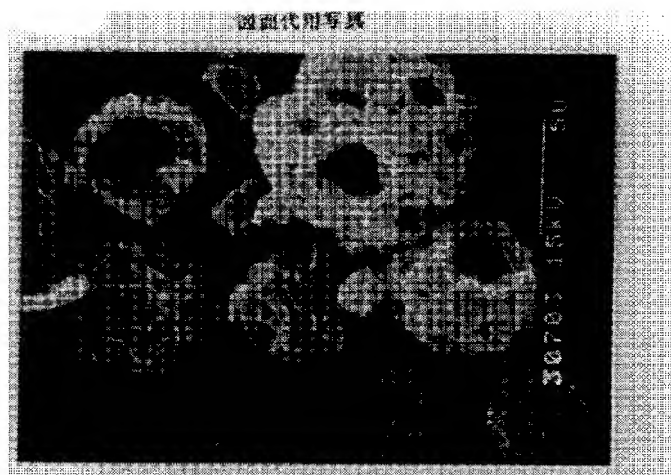
【図5】試験例1における試験方法を示す説明図である。

【図6】試験例1において実施例1で得た超音波造影剤を用いて得た造影効果の経時変化を示すグラフである。

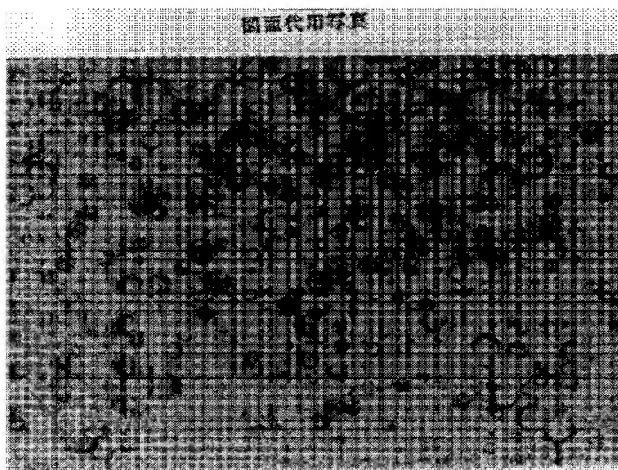
【図7】実施例2および3で得た各微粒子を用いた容器前方の輝点の明るさの経時変化を示すグラフである。

【図8】実施例2および3で得た各微粒子を用いた容器内全体の輝点の明るさの経時変化を示すグラフである。

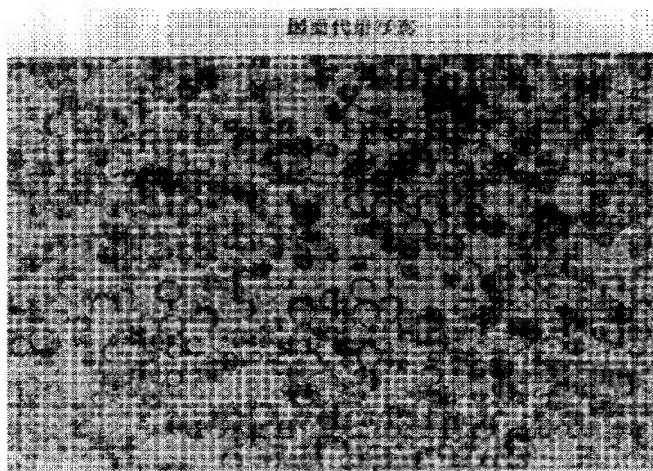
【図1】



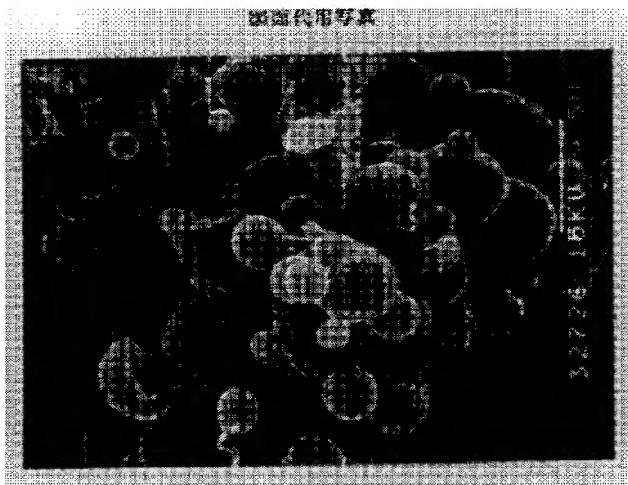
【図2】



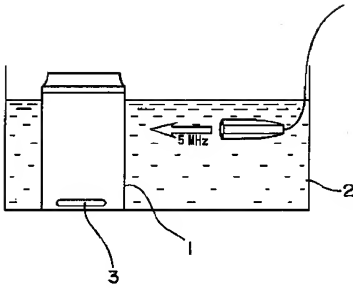
【図3】



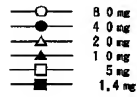
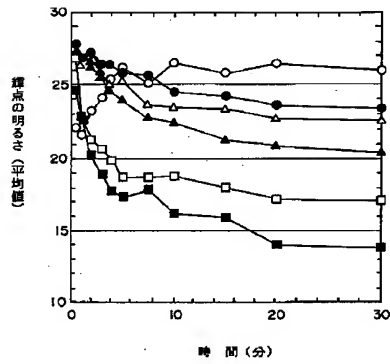
【図4】



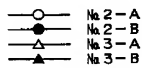
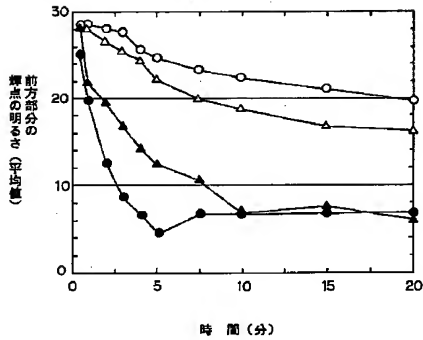
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

